

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
11 avril 2002 (11.04.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 02/29010 A2**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12N 5/02,  
5/06, 5/08, A61K 35/39, A61P 5/48

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR01/02945

(22) Date de dépôt international :  
21 septembre 2001 (21.09.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
00/12547 2 octobre 2000 (02.10.2000) FR

(71) Déposant : CENTRE HOSPITALIER REGIONAL  
UNIVERSITAIRE DE LILLE [FR/FR]; 2, avenue Oscar  
Lambret, F-59037 Lille Cedex (FR).

(72) Inventeurs: KERR-CONTE, Julie; 22, rue Henri Gruson,  
F-59130 Lambersart (FR). PATTOU, François; 22,  
rue Henri Gruson, F-59130 Lambersart (FR).

(74) Mandataires : BREESE, Pierre etc.; Breese-Majerowicz,  
3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,  
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,  
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING IN VITRO MAMMAL ISLET CELLS AND USES THEREOF

(54) Titre : PROCÉDE D'OBTENTION IN VITRO DE CELLULES INSULINO-SECRÉTRICES DE MAMMIFERE ET LEURS  
UTILISATIONS

(57) Abstract: The invention concerns a method for obtaining in vitro mammal islet cells, characterised in that it comprises the following steps: a) preparing mammal pancreatic tissues by pancreas removal; b) dissociating the pancreatic tissues obtained at step (a) into isolated pancreatic cells; c) optionally eliminating endocrine cells from the pancreatic cells isolated at step (b); d) inducing dedifferentiation of the cells isolated at step (b) into ductal precursor cells; e) inducing redifferentiation of the ductal precursor cells obtained at step (d) into islet cells. The invention also concerns the use of the resulting islet cells for preparing a pharmaceutical composition for use in the treatment of pancreatic pathologies and in particular diabetes.

(57) Abrégé: La présente invention concerne un procédé d'obtention in vitro de cellules insulino-sécrétrices de mammifère, caracté-  
risé en ce qu'il comporte les étapes suivantes: a) la préparation des tissus pancréatiques de mammifère par prélèvement de pancréas,  
b) la dissociation des tissus pancréatiques obtenus à l'étape (a) en cellules pancréatiques isolées, c) éventuellement l'élimination des  
cellules endocrines des cellules pancréatiques isolées à l'étape (b), d) l'induction de la dédifférenciation des cellules isolées à l'étape  
(b) en cellules précurseur canalaire, e) l'induction de la redifférenciation des cellules précurseurs canalaire obtenues à l'étape (d) en  
cellules insulino-sécrétrices. Elle concerne également l'utilisation des cellules insulino-sécrétrices ainsi obtenues pour la préparation  
d'une composition pharmaceutique utile pour le traitement des pathologies pancréatiques et notamment du diabète.

WO 02/29010 A2

PROCÉDÉ D'OBTENTION IN VITRO DE CELLULES INSULINO-  
SECRETRICES DE MAMMIFERE ET LEURS UTILISATIONS.

5                   La présente invention concerne un procédé  
d'obtention de cellules insulino-sécrétrices in vitro, à  
partir de tissu pancréatique. Elle concerne notamment  
l'obtention des cellules insulino-sécrétrices à partir des  
pancréas de patients atteints de pathologies pancréatiques  
10 et particulièrement de diabète. Elle concerne également  
l'utilisation de ces cellules pour des préparations  
destinées au traitement thérapeutique du diabète.

                  La thérapie cellulaire offre aujourd'hui  
15 d'importantes perspectives dans le traitement du diabète  
(Shapiro AM et al. Islet transplantation in seven patients  
with type 1 diabetes Mellitus using a glucocorticoid-free  
immunosuppressive regimen N Engl J Med 343:230-238, 2000) Le  
concept du traitement du diabète par la transplantation  
20 ectopique de cellules insulino-sécrétrices a déjà été  
validé. Au cours d'une pancréatectomie totale, l'isolement  
et la greffe intraportal des îlots endocrines du pancréas  
permettent de maintenir une sécrétion endogène, presque  
physiologique, d'insuline et le maintien de l'homéostasie  
25 glucidique pendant plus de dix ans (Pyzdrowski, K.L., et  
al. Preserved insulin secretion and insulin dependence in  
recipients of islet autografts. New England J. Med. 1992,  
327, 220-226).

30                   Cependant, malgré de nombreux progrès  
techniques, le rendement insuffisant et souvent aléatoire  
de l'isolement des îlots reste un frein majeur au  
développement de la thérapie cellulaire du diabète.  
Aujourd'hui la réunion des îlots provenant de plusieurs

donneurs reste le plus souvent nécessaire pour greffer une masse de tissu endocrine suffisante chez un patient diabétique et, étant donné le nombre limité de donneurs disponibles, l'utilisation actuelle des îlots de Langerhans humains primaires interdit néanmoins tout espoir de développement à grande échelle de la thérapie cellulaire de cette maladie.

Ainsi, des nouveaux procédés alternatifs d'obtention de cellules insulino-sécrétrices moins limités et utilisables chez l'homme ont été envisagés, tels que la manipulation génétique de cellules somatiques pour induire la synthèse d'insuline, l'immortalisation des lignées cellulaires ou encore l'utilisation de cellules animales. Cependant, des inconvénients subsistent, car d'une part la régulation transcriptionnelle coordonnée de la sécrétion d'insuline est complexe, et d'autre part l'utilisation clinique de cellules transformées d'origine animale est très controversée. Par conséquent, la conception des méthodes alternatives d'obtention de cellules insulino-sécrétrices demeure un enjeu majeur dans le cadre de la thérapie cellulaire du diabète.

Une autre approche tient compte des travaux expérimentaux récents qui ont mis en évidence dans le pancréas adulte, la présence des cellules souches pancréatiques, susceptibles de prolifération et de différenciation.

On connaît que le pancréas se forme au cours du développement embryonnaire à partir de l'endoderme (Le Douarin, N.M. " On the origin of pancreatic endocrine cells" . Cell, 1988, 53, 169-171) et que les trois types cellulaires pancréatiques existants dérivent de la

prolifération de l'épithélium pancréatique et de sa différenciation secondaire en tissu canalaire, endocrine ou acineux.

5                    Bien que les mécanismes de différenciation entre les différents types cellulaires pancréatiques ne soient pas complètement élucidés, on connaît certains marqueurs phénotypiques spécifiques de chacun d'entre eux. Ainsi, chez le rongeur, comme chez l'homme, le phénotype  
10 des cellules souches pancréatiques est de type canalaire comme le démontre l'expression par celles-ci des cytokératines 20 et 19 (Bouwens L. et al. " Cytokeratins as markers of ductal cell differentiation and islet neogenesis in the neonatal rat pancreas ". Diabetes. 1994, 43, 1279-  
15 1283 ; Bouwens L. et al. " Prolifération an differentiation in the human fetal endocrine pancreas ". Diabetologia, 1997, 40, 398-404).

                  On connaît également le phénomène, appelé  
20 nésidioblastose, dont le mécanisme demeure inconnu, qui reproduit à l'âge adulte le mode de formation embryonnaire des cellules endocrines du pancréas. La nésidioblastose n'est pas un phénomène spécifique d'espèce, de plus on l'observe chez l'homme dans certaines circonstances  
25 pathologiques. La nésidioblastose est également fréquente dans le parenchyme adjacent des tumeurs endocrines du pancréas, qu'elles soient sporadiques ou provoquées par la mutation d'un gène suppresseur tumoral, dans des néoplasies endocriniennes . Dans certains cas exceptionnels on peut  
30 même observer une néosidioblastose diffuse de l'ensemble du pancréas.

Ces observations suggèrent donc la persistance dans le pancréas mature humain de cellules souches

quiescentes présentant un phénotype canalaire et capables dans certaines conditions de différenciation endocrine.

Des procédés de culture in vitro de cellules de  
5 pancréas adulte qui tirent partie de ces observations et reproduisent ce phénomène de nésidoblastosis in vitro ont déjà été décrits. Par exemple, les demandes de brevet européen EP 758376 et EP 871455 décrivent un procédé d'obtention de cellules insulino-sécrétrices à partir des  
10 préparations pancréatiques de tissu adulte, enrichies en cellules souche.

Cependant, le procédé d'obtention de cellules insulino-sécrétrices décrit dans ces documents présente  
15 plusieurs inconvénients. D'une part, il inclut une première étape de culture destinée à enrichir la population cellulaire pancréatique, isolée lors de la première étape du procédé, en cellules souches. Cette étape, étalée sur plusieurs semaines, prévoit la culture des cellules  
20 pancréatiques dans un milieu pauvre en sérum de manière à éliminer 99% des cellules pancréatiques, dont la plupart sont des cellules différenciées exocrines. Le but étant de ne maintenir en culture qu'une population cellulaire enrichie en cellules souches précurseurs d'îlots. Après  
25 avoir effectuée cette sélection, la faible population de cellules souche isolées subit une étape d'expansion pendant plusieurs semaines. La troisième étape du procédé met en œuvre la différenciation des cellules souches en cellules insulino-sécrétrices. Un autre inconvénient majeur inhérent  
30 à ce procédé réside dans le faible nombre de cellules souches que l'on peut obtenir après avoir éliminé la quasi totalité (99%) des cellules pancréatique différenciées. Ce procédé d'obtention d'îlots endocrine in vitro chez le

mammifère adulte reproduit la voie d'embryogenèse pancréatique telle qu'elle s'effectue in vivo.

5 Dans le cadre de la présente invention, les inventeurs sont parvenus à induire pour la première fois in vitro une transdifférenciation de cellules exocrines pancréatiques différenciées vers un autre phénotype différencié. Cette transdifférenciation n'est pas basée sur la voie physiologique empruntée par l'embryogenèse  
10 pancréatique in vivo et ouvre ainsi une voie alternative à l'obtention de cellules pancréatiques différenciées.

De manière tout à fait surprenante, les inventeurs sont maintenant parvenus à induire in vitro une  
15 dédifférenciation des cellules exocrines du pancréas adulte, constituant plus de 95% du parenchyme pancréatique, sous certaines conditions de culture, pour obtenir des cellules dédifférenciées, ci-après appelées cellules précurseurs canalaire.

20

Ces cellules précurseurs canalaire, sont à leur tour cultivées dans un milieu adéquat, dans lequel on induit une redifférenciation qui les transforme en cellules endocrines, insulino-sécrétrices.

25

Dans le cadre de la présente invention on entend par :

Différenciation : le fait pour une cellule d'acquérir une fonction spécialisée. Il s'agit du processus conduisant à l'expression de propriétés phénotypiques caractéristiques d'une cellule fonctionnellement mature in  
30 vivo.

Rédifférenciation : le fait pour une cellule de réacquérir une fonction spécialisée qu'elle a précédemment perdue, suite à une dédifférenciation.



Dédifférenciation ou retrodifférenciation: le fait pour une cellule spécialisée de régresser vers une forme embryonnaire moins spécialisée. La dédifférenciation comporte la perte, temporaire ou définitive, des caractéristiques génotypiques et/ou phénotypiques différenciées que ladite cellule spécialisée ait pu acquérir au cours de son développement. La dédifférenciation est soit un processus adaptatif impliquant que le phénotype différencié peut être atteint en administrant les inducteurs adéquats, ou bien sélectif, impliquant alors que les cellules précurseurs ont été choisies en raison de leur potentiel prolifératif plus élevé.

Transdifférenciation : Il s'agit d'un processus biologique de reprogrammation de l'expression génétique depuis un phénotype cellulaire vers un autre. La transdifférenciation comprend une première étape de dédifférenciation et une deuxième étape de redifférenciation.

Cellule souche: Cellule ayant des capacités autoréplcatives illimitées, susceptible de produire au moins une descendance hautement différenciée de cellules unipotentes/bipotentes/multipotentes/pluripotentes/totipotentes.

Cellule dédifférenciée: toute cellule qui n'exprime ni le phénotype de la cellule originale ni celui des cellules subséquentes différenciées.

Cellule précurseur épithéliale: Cellule susceptible de se différencier, mais seulement pour devenir une cellule appartenant à son propre type tissulaire épithélial, et non à un autre. Les cellules précurseurs canaux appartiennent à cette catégorie.

Cellule bêta : cellule des îlots de Langerhans du pancréas qui secrète l'hormone insuline en réponse au glucose et autre sécrétogogues.

5 Les inventeurs ont effectué d'importants travaux de recherche afin de prouver, tant au niveau moléculaire, comme au niveau protéique, que sous des conditions de culture adéquates, les cellules exocrines de pancréas se différencient en cellules précurseurs, portant un phénotype caractéristique des cellules épithéliales canalaire. La redifférenciation postérieure, dans des conditions de culture adéquates, de ces cellules précurseurs exocrines permet la préparation, en grande quantité, des cellules insulino-sécrétrices. Lesdites  
10 cellules épithéliales canalaire re-exprimant le facteur IPF-1, un marqueur spécifique des cellules bêta insulino-sécrétrices.

Des manifestations in vivo de cette redifférenciation cellulaire avaient déjà été observées in vitro, mais les inventeurs l'ont pour la première fois reproduit in vitro et l'ont utilisé dans le but d'obtenir une source abondante de cellules pancréatiques précurseurs endocrines. Le procédé qu'ils ont mis en œuvre ouvre la  
20 voie à des innovations cliniques importantes dans le domaine du traitement thérapeutique de pathologies pancréatiques, notamment du diabète. Le nouveau procédé d'obtention de cellules insulino-sécrétrices par transdifférenciation mis en œuvre dans le cadre de  
25 l'invention procure une source abondante de précurseurs de cellules bêta. Ceci permet d'envisager aisément d'une part une thérapie allogénique des pathologies pancréatiques, notamment du diabète et d'autre part, à une thérapie cellulaire autologue. En effet, une pancréatectomie  
30

partielle permettra à partir d'un fragment réduit du  
pancréas du patient de produire, par le procédé de  
l'invention, des cellules insulino-sécrétrices autologues  
en quantité suffisante pour restaurer les fonctions  
pancréatiques.

La présente invention met en œuvre un procédé  
d'obtention in vitro de cellules insulino-sécrétrices  
partant d'une préparation de cellules pancréatiques de  
pancréas adulte, éventuellement dépourvu de cellules  
endocrines.

Le procédé d'obtention de cellules insulino-  
sécrétrices de l'invention est remarquable car il  
s'effectue précisément à partir de la population cellulaire  
exocrine qui compte pour plus de 95% des cellules présentes  
dans le tissu pancréatique et non à partir des seules  
cellules souches isolées.

Il est ainsi possible d'obtenir par cette voie  
jusqu'à 1,5 milliard de cellules précurseurs canalaire à  
partir d'un seul pancréas humain, soit 100 000 fois plus  
qu'à partir des canaux pancréatiques eux-mêmes.

Ainsi, l'invention se rapporte à un procédé  
d'obtention in vitro de cellules insulino-sécrétrices de  
mammifère, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes  
suivantes :

- a) la préparation des tissus pancréatiques de  
mammifère par prélèvement de pancréas ,
- b) la dissociation des tissus pancréatiques  
obtenus à l'étape (a) en cellules pancréatiques isolées,

c) éventuellement l'élimination de cellules endocrines des cellules pancréatiques isolées obtenues à l'étape (b),

5 d) l'induction de la dédifférenciation des cellules isolées à l'étape (c) en cellules précurseurs canalaire,

e) l'induction de la redifférenciation des cellules précurseurs canalaire obtenues à l'étape (d) en cellules insulino-sécrétrices.

10

Selon un mode préféré de mise en œuvre du procédé de l'invention, la dissociation des tissus pancréatiques à l'étape (b) est effectuée au moyen d'une digestion enzymatique.

15

Avantageusement, les cellules pancréatiques isolées à l'étape (b) sont dépourvues de cellules endocrines avant l'étape (d) d'induction de la différenciation dans une étape (c).

20

Avantageusement l'élimination des cellules endocrines des cellules pancréatiques de l'étape (c) est effectuée au moyen d'une centrifugation en gradient de densité.

25

Préférentiellement, l'élimination des cellules endocrines des cellules pancréatiques à l'étape (c) est effectué par retrait de la fraction de cellules endocrines récupérée dans la gamme de densités comprise entre 1,027 g/l à 1,104 g/l, de préférence entre 1,045.g/l à 1,097 g/l.

30

Tout préférentiellement les cellules pancréatiques dépourvues de cellules endocrines obtenues à l'étape (c) sont des cellules exocrines récupérées dans le culot du gradient de densité.

Selon un autre mode de mise en œuvre du procédé de l'invention, l'élimination des cellules endocrines à l'étape (c) est effectuée au moyen d'un séparateur de cellules.

Avantageusement la dédifférenciation de l'étape (d) comprend les sous-étapes suivantes:

i) la mise en culture des cellules obtenues à l'étape (c) à une concentration cellulaire comprise entre  $1 \times 10^6$  cellules/ml et  $10 \times 10^6$  cellules/ml, de préférence entre  $2 \times 10^6$  cellules/ml et  $6 \times 10^6$  cellules/ml, dans un milieu de culture comprenant :

- du glucose à une concentration comprise entre 1g/l et 10 g/l, de préférence entre 2g/l et 5 g/l.

- éventuellement du sérum, choisi parmi le sérum de veau fœtal, du sérum bovin ou du sérum humain, à des concentrations supérieures à 8%, de préférence comprises entre 10% et 15%, final en volume.

- un mélange d'insuline, transferrine, sélénium utilisé à une concentration comprise entre 0,2% et 3%, de préférence entre 1,0% et 2,5%,

- éventuellement des facteurs empêchant la croissance des fibroblastes à une concentration comprise entre 20 µg/ml et 100 µg/ml, de préférence entre 30 µg/ml et 60 µg/ml,

- éventuellement des antibiotiques, des antifongiques,

pendant une durée comprise entre 4 à 9 jours, de préférence de 5 à 7 jours,

ii) la récupération des cellules précurseurs canalaire obtenues à l'étape (i).

Avantageusement l'induction de la redifférenciation de l'étape (e) comprend les sous-étapes suivantes:

5 i) éventuellement le décollement des cellules précurseurs canalaire obtenues à l'étape (d)

ii) la mise en culture des cellules précurseurs canalaire obtenues à l'étape (i) à des concentrations cellulaires comprises entre  $3,5 \times 10^5$  cellules /  $25\text{cm}^2$  et  $4 \times 10^6$  cellules /  $25\text{cm}^2$ , de préférence de  $7 \times 10^5$  cellules /  $25\text{cm}^2$  à  $3 \times 10^6$  cellules /  $25\text{cm}^2$ , dans un milieu de culture comprenant:

- du glucose à des concentrations comprises entre 1g/l et 10 g/l, de préférence entre 2 g/l et 5 g/l.

15 - éventuellement du sérum, choisi parmi le sérum de veau fœtal, du sérum bovin ou du sérum humain, à des concentrations supérieures à 2,5%, de préférence comprises entre 5% et 15%, final en volume.

- éventuellement un mélange d'insuline, transferrine, sélénium utilisé à une concentration comprise entre 0,2% et 5 %, de préférence entre 0,5% et 2%,

20 - éventuellement des antibiotiques et des antifongiques,

- éventuellement en présence d'une matrice, pendant une durée comprise entre 12 heures et 36 heures,

25 iii) le retrait dudit milieu de culture, et des cellules non adhérentes éventuellement présentes,

iv) la mise en culture des cellules obtenues à l'étape (iii) dans un milieu de culture tel que celui utilisé à l'étape (i), comprenant éventuellement des facteurs de croissance,

30 pendant une durée comprise entre 4 et 12 jours, de préférence entre 5 et 10 jours,

pour obtenir des cellules endocrines insulino-sécrétrices, et

v) la récupération des cellules insulino-sécrétrices obtenues à l'étape (iv).

5 Selon une mise en œuvre préférée du procédé de l'invention, le décollement des cellules à la sous-étape (i) de l'étape (e) est effectué avec de la trypsine/EDTA à des concentrations comprises entre 0,01% et 0,1% de trypsine, de préférence de 0,015 et 0,03 et d'EDTA comprises entre 0,1 mM et 1 mM de préférence de 0,25mM et  
10 0,75 mM

Selon un mode de réalisation préférée du procédé de l'invention la matrice mis en œuvre pour la culture des cellules à la sous-tape (ii) de l'étape (e) est choisie  
15 parmi le collagène type IV, 804G, le collagène type I, le Matrigel ou ses équivalents connus de l'homme du métier.

Avantageusement, les tissus pancréatiques disséqués à l'étape (a) sont obtenus à partir du pancréas  
20 d'un adulte humain en état de mort cérébral.

De préférence, les tissus pancréatiques disséqués à l'étape (a) sont obtenus à partir d'un fragment d'un pancréas d'un patient vivant atteint d'une pathologie pancréatique et tout préférentiellement à partir d'un  
25 fragment d'un pancréas d'un patient vivant atteint d'un diabète.

L'invention concerne également des cellules  
30 insulino-sécrétrices préparées par le procédé de l'invention.

L'invention concerne également l'utilisation des cellules insulino-sécrétrices préparées par le procédé

de l'invention pour la fabrication d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des pathologies pancréatiques humaines, et plus particulièrement destinée au traitement du diabète.

5

L'invention a également pour objet une méthode d'administration des cellules insulino-sécrétrices préparées selon le procédé de l'invention au moyen d'un cathéter intraportale percutané.

10

L'invention a également pour objet un pancréas bioartificiel constitué par les cellules insulino-sécrétrices préparées selon le procédé de l'invention cultivées après macroencapsulation selon des procédés connus en soi de l'homme du métier.

15

Les inventeurs ont effectué d'importants travaux de recherche visant à prouver qu'une population de cellules pancréatiques exocrines non-bêta 1 peut être effectivement obtenue in vitro, à partir du tissu pancréatique exocrine.

20

En premier lieu, la preuve de la dédifférenciation cellulaire in vitro des cellules exocrines pancréatiques, dans un milieu de culture adéquat a été apportée par vérification de la perte quasi complète d'expression d'amylase et une augmentation de l'expression de marqueurs canalaire (cytokératine 19, cytokératine 7, carbohydre antigen 19-9).

25

30

Pour la première fois les travaux que les inventeurs ont effectués ont démontré une re-expression du facteur-1 promoteur de l'insuline (IPF-1) ou de ses équivalents: la séquence homéotique pancréatique duodénale



(PDX-1), la séquence homéotique d'îlot duodénal 1 (IDX-1), le facteur 1 de transactivation de la somatostatine (STF-1) par les cultures cellulaires pancréatiques au niveau protéique et ARNm.

5

Le facteur IPF-1 est une protéine homodomaine essentiellement présente dans les cellules bêta différenciées du pancréas adulte (Ohlsson H. et al. " IPF-1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene" ; The EMBO journal, 12 :4251-4259, 1993), fonctionnant comme regulator principal de phenotype b.

10

L'expression d'IPF-1/PDX-1 est conservée dans des cellules bêta humaines qui ont perdu leur capacité à exprimer de l'insuline, après une expansion de 30 000 fois.

15

Durant l'ontogénie pancréatique, l'expression du facteur IPF-1 au niveau des canaux primitifs apparaît comme essentielle pour la formation de cellules endocrines et exocrines chez la souris (Johnson J. et al. " Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice". Nature 371:606-609, 1994) et chez l'homme (Stoffers D.A. et al. " Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide, deletion in the human IPF1 gene coding sequence ". Nat.Genet. 15:106-110, 1997, son absence conduit à une agénésie pancréatique. Le facteur IPF-1 est également re-exprimé de manière significative dans les cellules canalaire en cours de prolifération durant la régénération pancréatique chez le rongeur adulte. Les auteurs ont récemment mis en évidence l'expression d'IPF-1 au sein des canaux humains adultes pancréatiques des patients avec une nésidoblastose. Par conséquent, le facteur IPF-1 s'avère être un marqueur des cellules canalaire qui récupèrent leur pluripotence pour se redifférencier ultérieurement en

20

25

30

n'importe quel type cellulaire pancréatique (Sharma A. et al. " The homeodomain protein IDX-1 increases after an early burst of proliferation during pancreatic regeneration ". Diabetes 48:507-513, 1999.

5 Etant donné que l'expression du facteur IPF-1 dans des cellules canalaire adultes semble être une condition préalable pour leur redifférenciation en cellules bêta dans les modèles animaux, l'expression du facteur IPF-1 dans les cellules canalaire humaines en culture fournit  
10 une évidence de leur redifférenciation potentielle et prouve que ces cellules sont des candidats précurseurs endocrines.

La redifférenciation postérieure, dans des  
15 conditions de culture adéquates, de ces cellules précurseurs endocrines permettront la préparation, en grande quantité, des cellules insulino-sécrétrices.

D'autres avantages et caractéristiques de  
20 l'invention apparaîtront à la lecture des exemples et des figures qui suivent rapportant le travail de recherche ayant permis de vérifier que dans les conditions de culture utilisées, on induit la dédifférenciation in vitro des cellules pancréatiques exocrines en cellules précurseurs  
25 canalaire. Ce sont ces cellules précurseurs canalaire qui sont ensuite redifférenciées en cellules endocrines, insulino-sécrétrices.

La figure 1 représente un schéma de  
30 l'embryogenèse pancréatique avec l'identification de l'origine des différents tissus pancréatiques et les marqueurs qui identifient les changements phénotypiques cellulaires mis en oeuvre dans le cadre de l'invention.

La figure 2 est un schéma du procédé de préparation de cellules insulino-sécrétrices mis en œuvre dans le cadre de l'invention.

5 La figure 3 illustre la transition phénotypique des cultures déterminée par une technique de slots blot.

La figure 4 montre l'expression de l'ARNm déterminée dans les préparations de cultures exocrines.

10

La figure 5 illustre l'analyse immunohistochimique, par Western Blot et les résultats PCR-RT des préparations exocrines avec l'immunomarquage spécifique des antigènes canaux CK19, CK7.

15

#### Cellules précurseurs canaux humaines.

Des cellules humaines présentant un phénotype de cellules précurseurs canaux sont obtenues en culture à partir de préparations pancréatiques. Des pancréas humains ont été prélevés à partir de donneurs humains adultes en état de mort cérébrale. Les pancréas ont été éventuellement distendus avec 80 ml d'une solution froide de collagenase (0,5 mg/ml, Liberase® ou de la Collagenase de type P, Roche Diagnostics, Meylan, France), diluée dans  
20 du milieu Hanks.  
25

Les pancréas sont dissociés selon la méthode automatisée de Ricordi (Ricordi, C. " Automated method for isolation of human pancreatic islets ". Diabetes 37 :413-420, 1988.avec quelques modifications (Kerr-Conte, J. et al. " Simple dithizone-stained multilayer test for selection of density gradient before human islet mass purification ". Transplant Proc. 26:4013-4015, 1994). Après  
30 la sélection des densités conduisant à une séparation

optimale, les îlots sont isolés par purification sur gradient discontinu de EuroFicoll® ou Histopaque® avec un séparateur de cellules COBE 2991.

5                    La fraction exocrine est récupérée dans le culot, lavée trois fois dans de la solution de Hanks', et mise en culture, a raison de  $2 \times 10^6$  cellules à  $6 \times 10^6$  cellules par boîte de culture de 75 cm<sup>2</sup>, dans du milieu de culture Dulbecco minimum essentiel (DMEM, avec 3g/l de glucose), contenant 10% de sérum de veau fœtal (FCS, Laboratoires Eurobio, Les Ulis, France), 1% d'insuline, transferrine, sélénium (ITS), et 50 µg/ml de Geneticine® (G418) afin de limiter la croissance de fibroblastes.

10                    Après 12 heures d'attachement et tous les deux/trois jours, le milieu de culture est changé; les cultures monocouches sont maintenues pendant 2 semaines.

#### Prolifération cellulaire

20                    Afin de vérifier la prolifération cellulaire, estimée dans les préparations exocrines, un µCi/ml de thymidine tritiée est ajouté au milieu de culture aux jours 1, 1,5, 2, 3, 4, 6 et 10. Les cellules ainsi traitées ont été lavées, précipitées avec de l'acide trichloracétique 5%, soniquées et solubilisées dans de l'hydroxyde de sodium (0,5M) et comptées dans un compteur bêta après y avoir ajouté du liquide de scintillation. Le nombre de coups par minute (cpm) a été exprimé par rapport à L'ADN, mesuré avec le réactif PicoGreen®.

30

#### RNA

L'expression d'IPF-1, insuline, et bêta-actine ont été estimés par une réaction RT-PCR sur les préparations de cellules exocrines .

L'ARN total a été isolé avec du RNazol® B et quantifié par spectrophotométrie (260 nm). L'ADNc a été synthétisé à partir de 2 µg d'ARN total avec des amorces oligo(DT)12-18 et une transcriptase inverse (M-MLV). La  
5 réaction PCR a été effectuée sur un aliquote d'un µl du produit de la réaction de RT en présence de 200 mM dNTP, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, des amorces: 25 pM (IPF-1) ou 5pM (bêta-actine) et 5U d'ADN polymérase AmpliTaq. Les jeux d'amorces incluent des amorces pour l'amplification de IPF-1 :  
10 5'CCATGGATGAAGTCTACC-3', 5'-GTCCTCCTCCTTTTCCAC-3' ; des amorces pour l'insuline : 5'-TGTGAACCAACACCTGTG-3', 5'-CGTCTAGTTGCAGTAGT-3' ; et des amorces pour la bêta-actine : 5'- ATCATGTTTGAGACCTCCAA-3', 5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3'.

15 La réaction PCR est effectuée dans un appareil à PCR programmable avec 35 cycles pour l'IPF-1 (94°C :une minute /52°C :une minute /72°C : une minute) et avec 27 cycles pour l'insuline (94°C : 30 secondes /53°C : 1 minute / 72°C : 30 secondes). Tous les produits PCR sont soumis à  
20 une électrophorèse sur un gel d'agarose à 2%, Après digitalisation avec une caméra digital à intégration (CDD) (COHU 4912), les intensités des bandes, exprimées en Unités Arbitraires, sont quantifiées au moyen du logiciel GelAnalysts® version 3.01 FR (GreyStone-Iconix).  
25 L'expression de chaque produit spécifique est normalisée selon les niveaux du contrôle interne constitué par l'expression de bêta-actine.

### Protéine

30 Une cinétique d'expression d'amylase, cytokératine 19, et IPF-1 a été effectuée sur les extraits protéiques des cultures.

Pour la réalisation des techniques de Slot et Western Blot, les cellules exocrines cultivées sont trypsinisées (0,025% trypsine-5mMEDTA) dans du tampon de Hank's exempt d'ions  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$  (Sigma-Aldrich) et lavées dans le milieu de culture. Les cellules sont homogénéisées dans de la glace dans un tampon salin phosphate-tamponné (PBS) supplémenté avec du glucose 0,25 M et lysées par ultrasonication. Les concentrations en protéine ont été mesurées avec le réactif acide bicinchinique. Pour les slots blots, les protéines totales (25  $\mu\text{g}$ ) ont été déposées sur des membranes de nitrocellulose en utilisant l'appareil de filtration Slot Blot Filtration manifolds (Amersham Life Science). Les membranes ont été saturées avec 5% de lait dans du PBS, incubées avec des anticorps dirigés contre l'amylase, la chromogranine A, le facteur IPF-1, la cytokératine CK19, dans du tampon de saturation dilué (1:10) durant deux heures. Les membranes ont ensuite été lavées deux fois avec du PBS et incubées avec une solution contenant un anticorps secondaire marqué avec de la peroxydase de radis diluée 1/2000ème dans la solution de saturation diluée (1/10) pendant une heure. Après lavage dans du PBS, la liaison des anticorps est visualisé avec le réactif d'augmentation de la luminescence (Kit ECL®, Amersham). Les intensités des spots ont été quantifiées avec l'appareil Image quant 5.0 (Molecular Dynamics) et exprimées en Unités Arbitraires (Phosphoimager). Pour le Western blot, une quantité totale de 50  $\mu\text{g}$  de protéine a été séparée par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide contenant 10% de sodium dodécyl sulfate et transférée sur une membrane de fluorure de polyvinylidène (PVDF, Amersham). La saturation des membranes et la réaction d'immunochimioluminescence ont été effectuées comme décrit précédemment.

### Immunohistochimie

L'immunohistochimie a été effectuée sur des cellules fixées dans de l'éthanol froid à 80% (-20°C, 10 minutes), avec des cytocentrifugeuses, fixées dans du 1% paraformaldéhyde (PFA) ou sur des sections en paraffine de  
5 tissu pancréatique fixé immédiatement après collecte dans de la formaline 10% ou du PFA.

Les anticorps (IPF-1, cytokératine 19 et 7  
10 insuline, chromogranin A) sont révélés avec le système Envision® (Dako), en utilisant divers substrats chromogéniques, soit de la 3,3' diaminobenzidine (DAB) , soit du 3-amino-9-ethylcarbazol (AEC), soit du Phtalobluue (Histomark Blue®). Les noyaux sont contrecolorés avec de  
15 l'hématoxyline de Carazzi.

### Apoptosis

L'apoptose cellulaire spécifique des acini est évaluée après immunomarquage avec des anticorps anti-  
20 amylase visualisé avec un anticorps de chèvre biotinylé dirigé contre les anticorps de lapin (KPL, Gaithersburg, MD, USA) et de la streptavidine conjuguée avec de l'isothiocyanate de fluorescéine (streptavidine-FITC) (Sigma-Aldrich). Les altérations nucléaires  
25 apoptotiques sont visualisées avec du Hoescht 33258 -5 µg/ml 10 minutes, 37°C, Sigma-Aldrich).

Adhérence sélective des cellules Pour exclure que des cellules non acineuses adhèrent de façon  
30 préférentielle, les cellules positives à l'amylase par rapport au nombre total de cellules (noyaux) ont été dénombré dans les boîtes avant et après 12 heures de culture.

Le nombre de cellules acineuses dans la fraction en croissance est déterminé par un double marquage de cellules cytocentrifugées après 12 heures et deux jours de culture avec de l'amylase et du Ki-67 qui marque les cellules dans toutes les phases de leur cycle de croissance exceptées les cellules en phase G0.

### Résultats

Les clusters cellulaires humain exocrins adhèrent après 12 heures de culture et s'étalent progressivement pour former des cultures monocouche. La prolifération cellulaire déterminée par l'incorporation de thymidine tritiée (3H) augmente rapidement, avec un pic après trois jours et seulement après une diminution lente de l'expansion. L'incorporation de thymidine (3H) exprimée en cpm/ $\mu$ g ADN  $\times 10^3$   $\pm$  SEM (n=3) est: 40,5  $\pm$  8,7 (jour 1), 79,3  $\pm$  24,2 (jour 1,5), 83,7  $\pm$  12,8 (jour 2), 95,4  $\pm$  5,4 (jour 3), 82,1  $\pm$  5,0 (jour 4), 42,9  $\pm$  21,5 (jour 6) et 68,5  $\pm$  5,1 (jour 10).

Les taux d'ADN et de protéine corrélerent avec les taux de prolifération avec la thymidine tritiée. La figure 3 illustre la transition phénotypique des cultures déterminée par les slots blots utilisant 25  $\mu$ g de protéines totales issues des cultures. Les protéines sont exprimées en Unités Arbitraires d'intégration. Cette figure 3 illustre le chargement effectif en protéines confirmé dans (n=3) les préparations en mesurant les taux de bêta-actine entre les puits; il n'y a pas de différences statistiques tout au long de la culture. Cette figure représente les analyses par Slot Blots sur 25  $\mu$ g de protéine totale. Les niveaux de bêta-actine ont été mesurés à partir de 3 préparations comme standard interne, contrôlant la quantité de protéine chargée par puits.



La figure 3A où le phénotype exocrine est révélé avec l'anti-amylase (■), le phénotype canalaire avec l'anti-CK19 (□), le phénotype endocrine avec l'anti-chromogranine A (●), illustre les taux élevés de protéine amylase exprimées par les préparations exocrines après leur isolement, alors que les taux des protéines canalaire (CK19) et endocrine (chromogranine A) sont inférieurs. Une réduction importante de la protéine amylase est observée après un jour de culture, ( $92 \pm 3,3$ ,  $p < 0,05$  versus le jour 1). La figure 3B avec l'anti-IPF1 (moyenne  $\pm$  ESM,  $P < 0,05$  v.s. jour 0), où l'intensité des spots est exprimée en unité arbitraire après intégration numérique illustre des slots blots qui prouvent que la protéine IPF-1 est présente à des taux infimes dans les préparations exocrines après l'isolement augmentent durant leur culture, et restent élevées. La figure 3C montre les Western blots représentatifs de cinq pancréas humains, révèle que la bande de 46 Kilodalton caractéristique de la protéine IPF-1 est faible ou indétectable immédiatement après l'isolement des cellules exocrines (jour 0) et s'intensifie au fur et à mesure de leur culture. Les résultats de Western blot sont confirmés avec deux anticorps anti-IPF-1 différents dirigés contre les domaines C-terminal et N-terminal. La figure 3D illustre l'étude cinétique obtenue en utilisant une visualisation plus sensible avec la trousse ECL plus et un analyseur d'images Phosphoimager®, soulignant que cette augmentation en protéine IPF-1 (3,2 fois) se manifeste rapidement dans les deux premiers jours de culture.

La figure 4 montre l'expression de l'ARNm déterminée dans les préparations de cultures exocrines ( $n=5$ ), normalisées pour l'expression de bêta-actine

La figure 4A illustre les produits de PCR avec les bandes spécifiques de l'IPF-1 (262 pb) et de la bêta-actine (314 pb).

La figure 4B illustre que l'expression moyenne d'IPF-1/bêta-actine est faible avant la culture et que celle-ci augmente rapidement de 10,5 fois après 3 jours (n=5,  $p < 0,001$ ) par rapport au jour 1 et reste élevée, avec des taux d'expression huit fois supérieur, au bout d'une semaine et sept fois supérieur au bout de deux semaines en comparaison au jour 1 ( $9 = 0,08$  versus jour 1 ;  $p < 0,001$  versus jour 0).

La figure 4C où (O) représente l'expression de l'insuline normalisée par rapport à la bêta-actine (n=5 ;  $P > 0,05$  comparé au jour 0) et (■) représente l'expression de l'insuline à partir de préparations endocrines purifiées (n=5), illustre la détermination de l'ARNm de l'insuline dans les préparations exocrines afin de contrôler la contamination avec des population de cellules endocrines durant la culture (des îlots (n=4,  $71 \pm 6\%$  purs) sont utilisés en tant que contrôle positif). Les taux d'ARNm dans les cultures exocrine demeurent inférieurs (par exemple entre 7% (jour 0) et 2,5% (jours 3, 7) à ceux des îlots contrôle. Il n'a pas été observé des différences significatives entre les taux des jours J0, J3 ni J7.

La figure 5 illustre l'analyse immunohistochimique, complémentaire du Slot blot, du Western Blot et des résultats PCR-RT montrant que la culture des préparations exocrines durant une semaine conduit à la perte de l'immunomarquage spécifique de l'amylase (non montré), et à une augmentation du marquage des antigènes canaux CK19, CK7.

La figure 5A illustre qu'après 7 jours de culture, les cellules montrent un phénotype canalaire

révélé avec un marquage dominant pour l'expression du CK19  
Le marquage de l'insuline est toujours négatif dans les  
préparations exocrine cultivées, par conséquent, le  
marqueur neuroendocrine Chromogranine A a été employé pour  
5 évaluer la contamination des préparations exocrines avec  
des îlots. La figure 5B (flèche) illustre que la  
contamination avec des cellules endocrines est limitée et  
demeure inférieur à 5%, à la fois dans les préparations  
initiales ainsi qu'au terme de la culture. Un double  
10 immunomarquage a été effectué pour établir que la plupart  
de cellules dans les cultures dérivés des préparations  
exocrines sont des cellules canalaire (cellules CK19/CK7  
positives) et IPF-1 positives soit dans le compartiment  
cytoplasmique, soit dans le compartiment nucléaire (CK  
15 7/IPF-1, illustrées Figure 5C). Les rares cellules IPF-1  
positives et CK 7 négatives (tête de flèche) correspondent  
vraisemblablement à des cellules bêta contaminantes.

Afin d'exclure une adhérence sélective du tissu  
20 exocrine, les inventeurs ont comparé les préparations  
immunomarkuées avec de l'amylase /Hoescht avant le jour J0  
et 12 heures après leur mise en culture.

Environ 60% (n=2, 59%±1 en triple) de la  
totalité des cellules présentent t une coloration à  
25 l'amylase au jour J0 (donc 41% non acineuses) et ce  
pourcentage demeure identique après 12 heures de culture.

L'apoptose est surveillé par immunomarkuée avec  
un anticorps anti-amylase/Hoescht 33258 (n=2)

30

Les signes nucleaires d'apoptose ont été  
virtuellement absente des cultures exocrines, en  
particulier durant le changement principal phénotypique  
(Jour 3). Au jour 5, un petit nombre de cellules en culture

présentent des noyaux en forme de demi-lune, indicateurs d'un processus d'apoptose, cependant ils demeurent négatifs pour la coloration avec l'annexine V, un marqueur précoce de l'apoptose

5                   Inversement, un double immunomarquage des préparations après 12 heures et après deux jours (n=2) pour l'amylase et Ki-67, un antigène nucléaire exprimé durant toutes les phases du cycle cellulaire excepté G0, montre que la plupart de cellules acineuses forment partie de la  
10                   fraction en croissance. Au bout d'environ 12 heures de culture, 40% de la totalité des cellules sont des cellules acineuses dans le cycle cellulaire (Amy+/Ki-67+), 15% sont des cellules acineuses qui ne sont pas en cycle (Amy+/Ki-67-), 43% des cellules sont des cellules non-acineuses en  
15                   cycle (Amy-/Ki-67 +), ainsi, seulement 17% des cellules sont en phase G0 du cycle cellulaire et sont par conséquent Ki-67 négatives. Après deux jours de culture, lorsque l'expression de l'amylase est encore visible par des techniques immunohistochimiques et les niveaux de  
20                   prolifération (thymidine tritiée) sont proches des pics, 51,5% des cellules sont des cellules acineuses (Amy+/ki-67-), 42% des cellules sont de cellules non-acineuses en cycle (Amy-/Ki-67+).

                  Le rôle du facteur de transcription IPF-1 dans  
25                   la néogénèse des îlots est supporté par son expression accrue dans les canaux pancréatiques, le site des précurseurs cellulaires endocrines, dans plusieurs modèles de régénération pancréatique. L'expression du facteur IPF-1 dans des cellules canalaire récemment divisées appuie  
30                   l'hypothèse que toutes les cellules canalaire adultes peuvent récupérer leur pluripotence (par exemple leur capacité de cellules souches), (Bonner-Weir S. et al. "Partial pancreatectomy as a model of pancreatic regeneration" In Pancreatic Growth and Regeneration.

Sarvetnick N. Ed. Paris, Karger Landes Systems, 1997, p.138-153).

Le rôle décisif du facteur IPF-1/PDX-1 dans la différenciation cellulaire endocrine de cellules endodermes digestives a été récemment confirmé dans le foie (Ferber S et al. Pancreatic duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin induced hyperglycemia Nature Med 6: 568-572,2000).

La transition des préparations cellulaires exocrines en culture vers un phénotype canalaire a été bien caractérisé dans diverses espèces, mais le mécanisme exact qui y est impliqué demeure controversé. La ligation du canal de rat est suivie d'une déletion apoptotique des cellules acineuses simultanément à une prolifération de cellules canalaire. Logsdon et al., travaillant sur des cellules acineuses de souris ont également montré une perte substantielle de tissu exocrine (ADN, protéines) précédant la prolifération cellulaire.

Inversement, lors des expériences menées par les inventeurs dans le cadre de la présente invention, les augmentations rapides de la prolifération cellulaire, des taux d'ADN et de protéine observées immédiatement après l'attachement cellulaire (12 heures) sont corrélées avec l'augmentation initiale des marqueurs cellulaires canaux et avec la chute des niveaux d'amylase.

Un attachement sélectif des cellules canaux et la mort et/ou apoptose des cellules acineuses ne peut pas expliquer ces faits dans le modèle humain car la proportion de cellules amylase positives initialement présentes dans les préparations demeure identique après 12

heures de culture lorsque les plaques sont lavées des cellules non attachées. Alternativement, cette perte rapide de l'amylase peut être due à une diminution des taux d'amylase dans les cellules acineuses.

5

Aucune des méthodes utilisées pour évaluer l'apoptose, incluant des marqueurs précoces et tardifs, ne détecte des niveaux croissants d'apoptose durant la transition phénotypique (jour 3).

10

Par contre, la présence précoce de cellules Ki-67/amylase positives dans les cultures invoque leur prolifération potentielle et confirme que la transition phénotypique advient avec la prolifération cellulaire telle qu'il a été démontré sur d'autres modèles.

15

L'apparition d'un petit nombre de nuclei avec une forme de demi-lune est observée seulement après 5 jours de culture, après la transition phénotypique principal. L'absence d'une apoptose significative dans ces cultures et la présence de taux élevés de prolifération prouve que les cellules acineuses se sont dédifférenciées en cellules ayant un phénotype canalaire, simultanément avec la croissance rapide des cellules CK19 positive pre-existantes.

20

25

Ces cellules canalaire dérivées des populations exocrines expriment des taux faibles ou inexistantes de protéine IPF-1 ainsi que des taux faibles d'ARNm d'IPF-1 qui s'accroissent rapidement durant la culture. La bande de 46 kD, caractéristique d'IPF-1 est confirmée par deux anticorps anti-IPF afin d'exclure la détection, par ces techniques sensibles, d'IPF-1 dérivés des fractions minimales de cellules endocrines contaminantes,

30

des quantifications simultanées de l'ARNm de l'insuline ont été effectuées. Les niveaux de cet ARNm d'insuline sont initialement détectables dans les préparations lorsqu'ils sont comparés avec les niveaux trouvés pour les îlots, et demeurent pratiquement constants durant toute la période de culture.

L'immunohistochimie avec deux anticorps anti-IPF-1 localise l'expression d'IPF-1 sur les cellules canalaire (CK-7 positives). Seulement quelques cellules endocrines sont présentes (Figure 5). En utilisant des marqueurs pan-neuroendocrins incluant la Chromogranine A et la Synaptophysine, le nombre total de cellules endocrines dans la préparation initiale est estimé à 4,7!1,8% de la préparation initiale et 3,5!0,8% des cellules après 7 jours de culture (résultats non montrés).

La discordance entre cette faible (<5%) contamination endocrine des cultures exocrines, et l'intensité de l'immunomarquage IPF-1 et CK 19 (CK 7) contribuent à confirmer que le facteur IPF-1 ne provient pas essentiellement des cellules bêta contaminantes CK19 négatives. Les études de double marquage avec IPF-1 et Synaptophysine(non montrés) confirment ces données.

Les Westerns blots effectués avec des extraits de protéines totales isolées d'îlots humains purifiés montrent les deux formes de protéines avec la visualisation des deux bandes à 31 kD et 46 kD (données non montrées), révélées avec l'anticorps dirigé contre le domaine N-terminal de PDX-1. Les extraits de protéine à partir de préparations de cultures de cellules exocrines humaines montrent une bande principale à 46 kD et une bande cytoplasmique à 31 kD faible ou indétectable.

A différence des cellules IPF-1 positives mais CK 19 négatives montrées par Beattie et al. qui sont d'origine endocrine, la plupart de cellules dans les cultures dérivées des cellules exocrines manifestent un phénotype canalaire (positive pour CK 19, CK 7 et carbohydate 19-9 (résultats non montrés) et sont simultanément IPF-1 positives. Les cultures initiales montrées par Beattie et al. étaient insuline et IPF-1 positives, très différentes de celles décrites dans les expériences menées dans le cadre de la présente invention, impliquant que les cellules IPF-1 positives de leur étude sont des cellules bêta différenciées.

Ainsi, les inventeurs montrent que la différenciation/transdifférenciation rapide de cellules exocrines in vitro est associée simultanément à l'augmentation des marqueurs canaux et à la transcription du facteur IPF-1 tant au niveau de l'ARNm comme au niveau de la protéine.



## REVENDICATIONS

1) Procédé d'obtention in vitro de cellules  
5 insulino-sécrétrices de mammifère, caractérisé en ce qu'il  
comporte les étapes suivantes :

- a) la préparation des tissus pancréatiques de  
mammifère à partir de pancréas préalablement prélevés,
- b) la dissociation des tissus pancréatiques  
10 obtenus à l'étape (a) en cellules pancréatiques isolées,
- c) éventuellement l'élimination des cellules  
endocrines des cellules pancréatiques isolées à l'étape (b)
- d) l'induction de la dédifférenciation des  
cellules isolées à l'étape (b) en cellules précurseur  
15 canalaire,
- e) l'induction de la redifférenciation des  
cellules précurseurs canalaire obtenues à l'étape (d) en  
cellules insulino-sécrétrices.

2) Procédé selon la revendication 1,  
20 caractérisé en ce que la dissociation des tissus  
pancréatiques à l'étape (b) est effectuée par digestion  
enzymatique.

3) Procédé selon l'une quelconque des  
25 revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'élimination  
de cellules endocrines à l'étape (c) est effectuée au  
moyen d'une centrifugation en gradient de densité.

4) Procédé selon l'une quelconque des  
30 revendications 1 à 3 caractérisé en ce que l'élimination  
des cellules endocrines est effectuée par retrait de la  
fraction des cellules endocrines récupérées dans une gamme

de densités comprise entre 1,027 g/l et 1,104 g/l, de préférence entre 1,045.g/l et 1,097 g/l.

5                    5) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce les cellules exocrines dépourvues de cellules endocrines sont récupérées après centrifugation des cellules pancréatiques isolées à l'étape (b), dans le culot du gradient de densité.

10                   6) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'élimination des cellules endocrines est effectuée au moyen d'un séparateur de cellules.

15                   7) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 caractérisé en ce que la différenciation de l'étape (d) comprend les sous-étapes suivantes:

20                   i) la mise en culture des cellules obtenues à l'étape (c) à une concentration cellulaire comprise entre  $1 \times 10^6$  cellules/ml et  $10 \times 10^6$  cellules/ml, de préférence entre  $2 \times 10^6$  cellules/ml et  $6 \times 10^6$  cellules/ml, dans un milieu de culture comprenant :

25                   - du glucose à une concentration comprise entre 1g/l et 10 g/l, de préférence entre 2g/l et 5 g/l.

- éventuellement du sérum, choisi parmi le sérum de veau fœtal, du sérum bovin ou du sérum humain, à des concentrations supérieures à 8%, de préférence comprises entre 10% et 15%, final en volume.

30                   - un mélange d'insuline, transferrine, sélénium utilisé à une concentrations comprise entre 0,2% et 3%, de préférence entre 1,0% et 2,5%,

- éventuellement des facteurs empêchant la croissance de fibroblastes à une concentration comprise

entre 20 µg/ml et 100 µg/ml, de préférence entre 30 µg/ml et 60 µg/ml,

- éventuellement des antibiotiques, des antifongiques,

5 pendant une durée comprise entre 4 à 9 jours, de préférence de 5 à 7 jours,

ii) la récupération des cellules précurseurs canalaire obtenues à l'étape (i).

10 8) Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'induction de la redifférenciation de l'étape (e) comprend les sous-étapes suivantes:

i) éventuellement le décollement des cellules précurseurs canalaire obtenues à l'étape (d)

15 ii) la mise en culture des cellules précurseurs canalaire obtenues à l'étape (i) à des concentrations cellulaires comprises entre  $3,5 \times 10^5$  cellules /25cm<sup>2</sup> et  $4 \times 10^6$  cellules/25cm<sup>2</sup>, de préférence de  $7 \times 10^5$  cellules/25 cm<sup>2</sup> à  $3 \times 10^6$  cellules/25cm<sup>2</sup>, dans un milieu de culture comprenant:

- du glucose à des concentrations comprises entre 1g/l et 10 g/l, de préférence entre 2 g/l et 5 g/l.

25 - éventuellement du sérum, choisi parmi le sérum de veau fœtal, du sérum bovin ou du sérum humain, à des concentrations supérieures à 2,5%, de préférence comprises entre 5% et 15%, final en volume.

- éventuellement un mélange d'insuline, transferrine, sélénium à des concentrations comprises entre 0,2% et 5 %, de préférence entre 0,5% et 2%,

30 - éventuellement des antibiotiques et des antifongiques,

- éventuellement en présence d'une matrice, pendant une durée comprise entre 12 heures et 36 heures,

iii) le retrait dudit milieu de culture, et des cellules non adhérentes éventuellement présentes,

iv) la mise en culture des cellules obtenues à l'étape (iii) dans un milieu de culture tel que celui  
5 utilisé à l'étape (i), comprenant éventuellement des facteurs de croissance,

pendant une durée comprise entre 4 et 12 jours, de préférence entre 5 et 10 jours,

pour obtenir des cellules endocrines insulino-sécrétrices, et  
10

v) la récupération des cellules insulino-sécrétrices obtenues à l'étape (iv).

9) Procédé selon l'une quelconque des  
15 revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le décollement des cellules précurseurs canalaire obtenues à sous-étape (i) de l'étape (e) est effectué avec de la trypsine/EDTA, à des concentrations comprises entre 0,01% et 0,1% de trypsine, de préférence de 0,015 et 0,03 et d'EDTA  
20 comprises entre 0,1 mM et 1 mM de préférence entre 0,25mM et 0,75mM.

10) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que la matrice mis  
25 en œuvre pour la culture des cellules à la sous-étape (ii) de l'étape (e) est choisie parmi le collagène type IV, 804G, le collagène type I, le Matrigel.

11) Procédé selon l'une quelconque des  
30 revendications 1 à 10, caractérisé en ce que les tissus pancréatiques préparés à l'étape (a) ont été obtenus à partir d'un prélèvement préalable d'un fragment du pancréas d'un adulte humain en état de mort cérébral.

12) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que les tissus pancréatiques préparés à l'étape (a) ont été obtenus à partir d'un prélèvement préalable d'un fragment d'un pancréas d'un patient vivant atteint d'une pathologie pancréatique.

13) Procédé selon la revendication 12 caractérisé en ce que les tissus pancréatiques préparés à l'étape (a) ont été obtenus à partir d'un prélèvement préalable d'un fragment d'un pancréas d'un patient vivant atteint d'un diabète.

14) Préparation cellulaire susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 caractérisée en ce qu'elle comporte une concentration cellulaire comprise entre  $1 \times 10^6$  cellules/ml et  $10 \times 10^6$  cellules/ml, de préférence entre  $2 \times 10^6$  cellules/ml et  $6 \times 10^6$  cellules/ml

15) Utilisation d'une préparation cellulaire selon la revendication 14 pour la préparation d'une composition pharmaceutique utile pour le traitement des pathologies pancréatiques

16) Utilisation selon la revendication 15 pour le traitement du diabète.

17) Pancréas bioartificiel, caractérisé en ce qu'il comprend des cellules insulino-sécrétrices susceptibles d'être obtenues par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, mises en culture dans une matrice.

18) Pancréas bioartificiel, caractérisé en ce qu'il comprend des cellules insulino-sécrétrices susceptibles d'être obtenues par le procédé selon l'une  
5 quelconque des revendications 1 à 13, mises en culture dans une matrice.

Figure 1

## Neogenèse des cellules pancréatique et Marqueurs de phénotype cellulaire

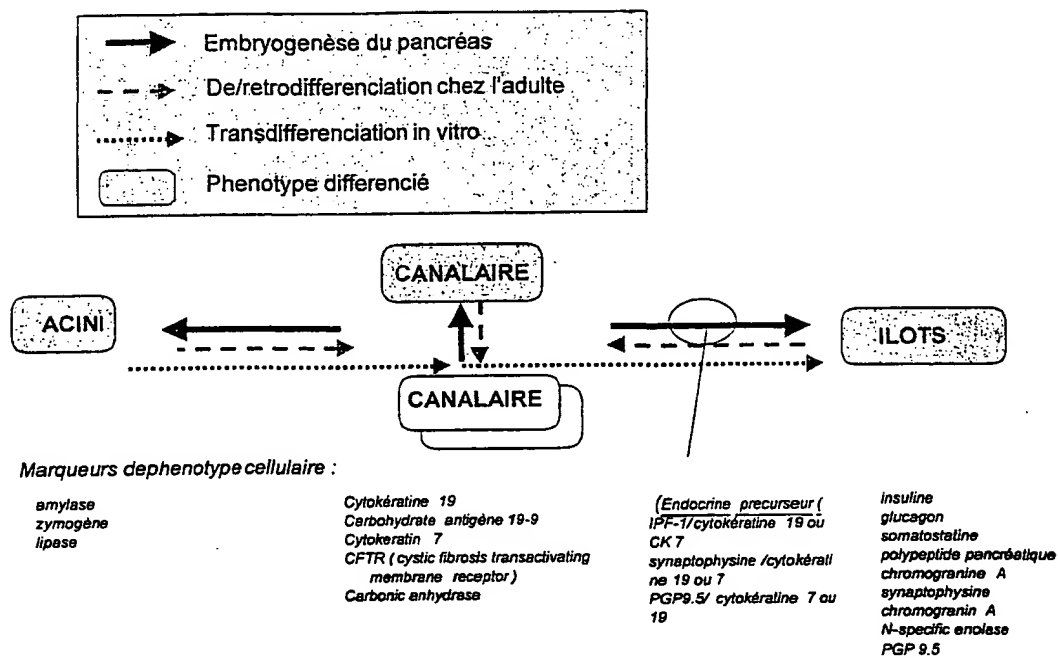
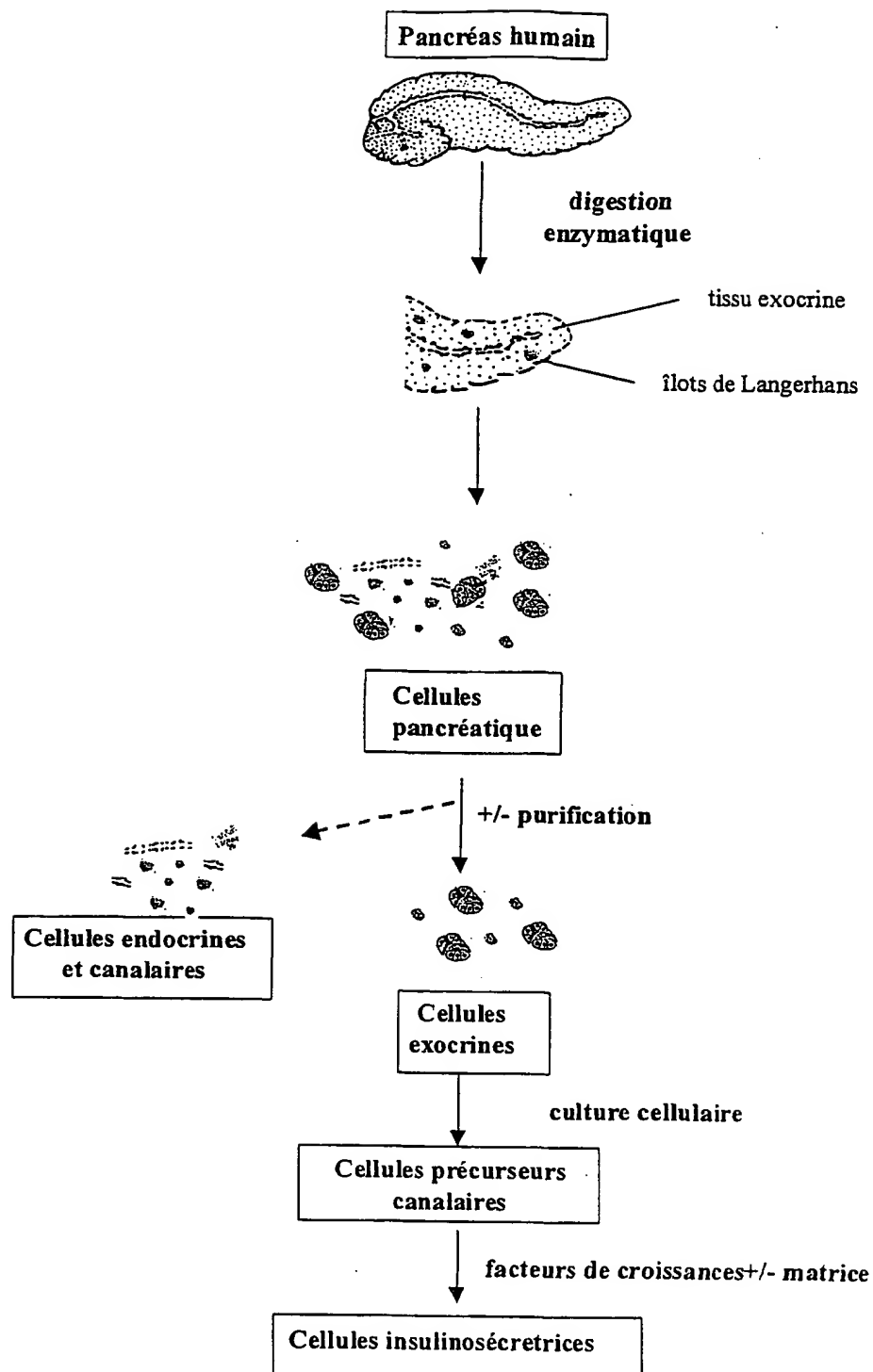
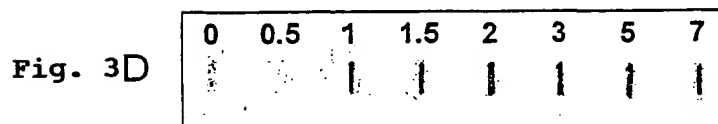
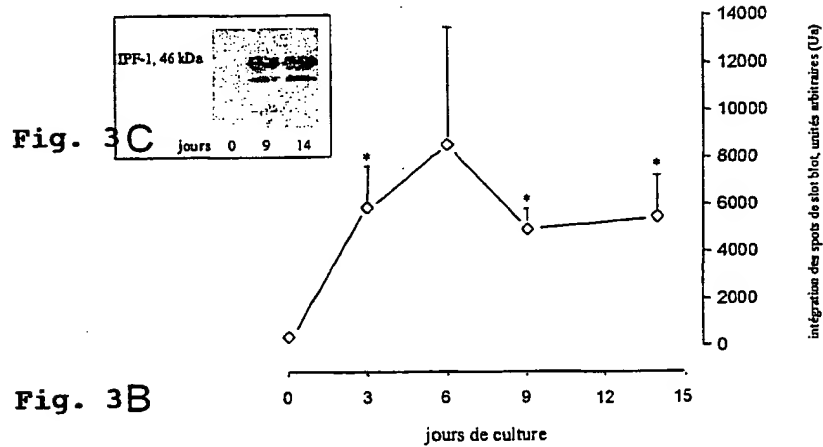
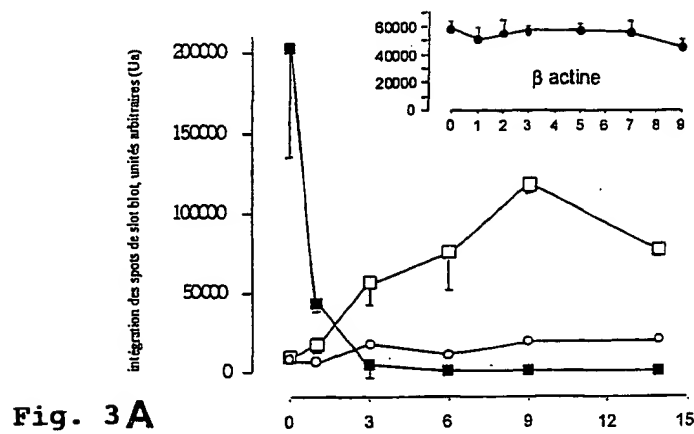


Figure 2

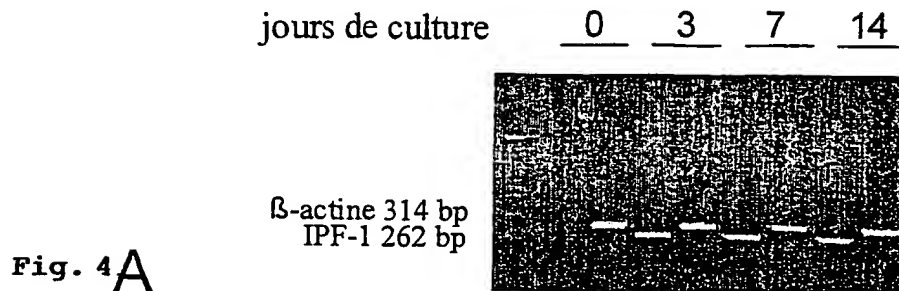




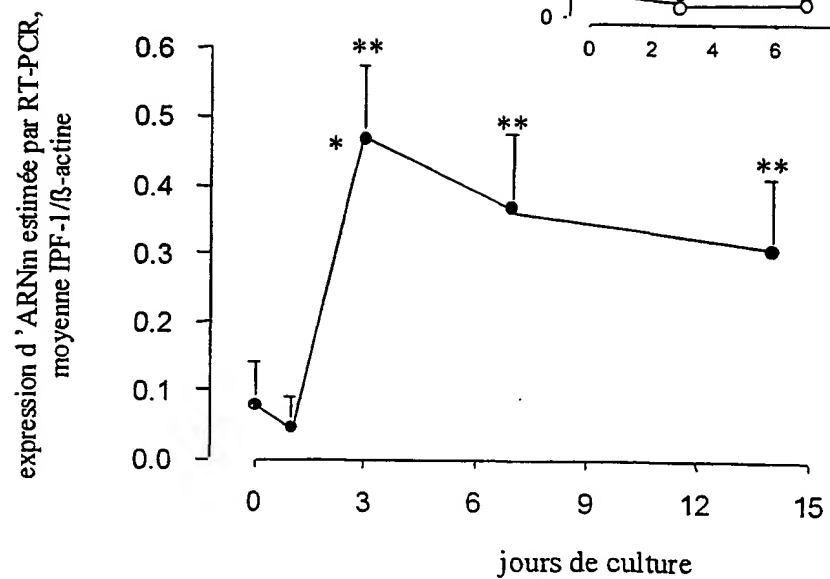
Expression protéique durant 14 jours de culture des préparations exocrines humaines (A et B, moyenne  $\pm$  ESM sur n=5).



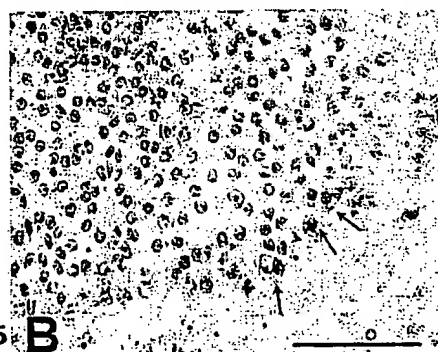
Analyses de RT-PCR sur l'expression de IPF1 au cours de la culture des préparations.



**Fig. 4B**



Caractérisation par immunohistochimie du phénotype des cultures de cellules précurseur canalaire. La barre représente 100  $\mu$ m

Fig. 5 **A**Fig. 5 **B**Fig. 5 **C**

## LISTE DE SEQUENCES

<110> Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille

<120> PROCEDE D'OBTENTION DE CELLULES INSULINO-SECRETRICES DE  
MAMMIFERE ET LEURS UTILISATION

<130> 8177PCT20sept2001

<140> PCT01/FR-xxxxxxx

<141> 2001-09-21

<150> FR00/12547

<151> 2000-10-02

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 18

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:AMORCE

<220>

<221> misc\_recomb

<222> (1)..(18)

<223> Amorce du facteur IPF-1

<400> 1

ccatggatga agtctacc

18

<210> 2

<211> 19

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:AMORCE

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(19)

<223> amorce du facteur IPF-1

<400> 2

gtcctcctcc tttttccac

19

<210> 3

<211> 18

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:AMORCE

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(18)  
<223> amorce de l'insuline

<400> 3  
tgtgaaccaa cacctgtg 18

<210> 4  
<211> 17  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:AMORCE

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(17)  
<223> amorce de l'insuline

<400> 4  
cgtctagttg cagtagt 17

<210> 5  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:AMORCE

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(19)  
<223> amorce de la beta-actine

<400> 5  
atcatgtttg agacctcca 19

<210> 6  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:AMORCE

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(20)  
<223> amorce de la beta-actine

<400> 6  
catctcttgc tcgaagtcca 20



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
11 avril 2002 (11.04.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 02/29010 A3**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12N 5/06,  
5/08, A61K 35/39, A61P 5/48

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR01/02945

(22) Date de dépôt international :  
21 septembre 2001 (21.09.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
00/12547 2 octobre 2000 (02.10.2000) FR

(71) Déposant : CENTRE HOSPITALIER REGIONAL  
UNIVERSITAIRE DE LILLE [FR/FR]: 2, avenue Oscar  
Lambret, F-59037 Lille Cedex (FR).

(72) Inventeurs : KERR-CONTE, Julie; 22, rue Henri Gru-  
son, F-59130 Lambersart (FR). PATTOU, François; 22,  
rue Henri Gruson, F-59130 Lambersart (FR).

(74) Mandataires : BREESE, Pierre etc.; Breese-Majerowicz,  
3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,  
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,  
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale  
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont  
reçues

(88) Date de publication du rapport de recherche  
internationale: 13 juin 2002

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING IN VITRO MAMMAL ISLET CELLS AND USES THEREOF

(54) Titre : PROCEDE D'OBTENTION IN VITRO DE CELLULES INSULINO-SECRETRICES DE MAMMIFERE ET LEURS  
UTILISATIONS

(57) Abstract: The invention concerns a method for obtaining in vitro mammal islet cells, characterised in that it comprises the following steps: a) preparing mammal pancreatic tissues by pancreas removal; b) dissociating the pancreatic tissues obtained at step (a) into isolated pancreatic cells; c) optionally eliminating endocrine cells from the pancreatic cells isolated at step (b); d) inducing dedifferentiation of the cells isolated at step (b) into ductal precursor cells; e) inducing redifferentiation of the ductal precursor cells obtained at step (d) into islet cells. The invention also concerns the use of the resulting islet cells for preparing a pharmaceutical composition for use in the treatment of pancreatic pathologies and in particular diabetes.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé d'obtention in vitro de cellules insulino-sécrétrices de mammifère, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes: a) la préparation des tissus pancréatiques de mammifère par prélèvement de pancréas, b) la dissociation des tissus pancréatiques obtenus à l'étape (a) en cellules pancréatiques isolées, c) éventuellement l'élimination des cellules endocrines des cellules pancréatiques isolées à l'étape (b), d) l'induction de la dédifférenciation des cellules isolées à l'étape (b) en cellules précurseur canalaire, e) l'induction de la redifférenciation des cellules précurseurs canalaire obtenues à l'étape (d) en cellules insulino-sécrétrices. Elle concerne également l'utilisation des cellules insulino-sécrétrices ainsi obtenues pour la préparation d'une composition pharmaceutique utile pour le traitement des pathologies pancréatiques et notamment du diabète.

WO 02/29010 A3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No

PCT/FR 01/02945

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N5/06 C12N5/08 A61K35/39 A61P5/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 46351 A (UNIV MCGILL ;ROSENBERG LAWRENCE (CA)) 10 August 2000 (2000-08-10) the whole document ---	1-18
X	GMYP V ET AL: "Adult human cytokeratin 19-positive cells reexpress insulin promoter factor 1 in vitro: Further evidence for pluripotent pancreatic stem cells in humans." DIABETES, vol. 49, no. 10, October 2000 (2000-10), pages 1671-1680, XP001010275 page 1677, column 2 -page 1679 --- -/--	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 April 2002

Date of mailing of the international search report

22/04/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Teyssier, B



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internati Application No

PCT/FR 01/02945

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>GMYS V ET AL: "Discarded exocrine tissue may be a potential source of human pancreatic precursors."</p> <p>ACTA DIABETOLOGICA, vol. 37, no. 3, September 2000 (2000-09), page 153 XP001010274</p> <p>20th Workshop of the Study Group on Artificial Insulin Delivery, Pancreas and Islet Transplantation; Igls, Austria; 28-30 January 2001 abstract</p> <p>---</p>	1-18
X	<p>BONNER-WEIR S ET AL: "In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue."</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 97, no. 14, 5 July 2000 (2000-07-05), pages 7999-8004, XP002172147 the whole document</p> <p>---</p>	1-18
Y	<p>GMYS V ET AL: "Expansion of human ductal pancreatic stem cells obtained from main duct, purified islet preparation, or exocrine tissue."</p> <p>ACTA DIABETOLOGICA, vol. 34, no. 2, 1997, page 107 XP001010264</p> <p>6th Congress of the International Pancreas and Islet Transplant Association; Milano, Italia; 24-27 September 1997 abstract</p> <p>---</p>	1-18
Y	<p>KERR-CONTE J ET AL: "Model for islet cell neogenesis from adult human pancreatic ductal epithelium in vitro."</p> <p>EXPERIMENTAL AND CLINICAL ENDOCRINOLOGY &amp; DIABETES, vol. 105, no. 4, 1997, pages A28-A29, XP001010265</p> <p>Satellite Meeting to the 16th International Diabetes Federation Congress, Joint Meeting with the European Association for the Study of Diabetes Islet Study Group on Pancreatic Beta Cell and Islet Research 1997: Development, Destruction, Regeneration; Helsingor, Denmark; 26-28 July 1997 abstract</p> <p>---</p>	1-18
P,X	<p>WO 00 78929 A (BONNER WEIR SUSAN ;TANEJA MONICA (US); JOSLIN DIABETES CT INC (US)) 28 December 2000 (2000-12-28) the whole document</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-18

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No

PCT/FR 01/02945

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	GMYR V ET AL: "Human pancreatic ductal cells: Large-scale isolation and expansion." CELL TRANSPLANTATION, vol. 10, no. 1, January 2001 (2001-01), pages 109-121, XP001010271 the whole document -----	1-18

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/02945

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 0046351	A	10-08-2000	AU	2527900 A		25-08-2000
			WO	0046351 A2		10-08-2000
			EP	1144595 A2		17-10-2001
<hr/>						
WO 0078929	A	28-12-2000	AU	5632600 A		09-01-2001
			EP	1185622 A1		13-03-2002
			WO	0078929 A1		28-12-2000
<hr/>						

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No

PCT/FR 01/02945

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**

CIB 7 C12N5/06 C12N5/08 A61K35/39 A61P5/48

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 00 46351 A (UNIV MCGILL ;ROSENBERG LAWRENCE (CA)) 10 août 2000 (2000-08-10) le document en entier	1-18
X	GMV R ET AL: "Adult human cytokeratin 19-positive cells reexpress insulin promoter factor 1 in vitro: Further evidence for pluripotent pancreatic stem cells in humans." DIABETES, vol. 49, no. 10, octobre 2000 (2000-10), pages 1671-1680, XP001010275 page 1677, colonne 2 -page 1679 -/--	1-18

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

15 avril 2002

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

22/04/2002

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Teyssier, B

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>GYMR V ET AL: "Discarded exocrine tissue may be a potential source of human pancreatic precursors."            ACTA DIABETOLOGICA,            vol. 37, no. 3, septembre 2000 (2000-09),            page 153 XP001010274            20th Workshop of the Study Group on Artificial Insulin Delivery, Pancreas and Islet Transplantation; Igls, Austria;            28-30 January 2001            abrégé</p>	1-18
X	<p>-----</p> <p>BONNER-WEIR S ET AL: "In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue."            PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES,            vol. 97, no. 14,            5 juillet 2000 (2000-07-05), pages            7999-8004, XP002172147            le document en entier</p>	1-18
Y	<p>-----</p> <p>GYMR V ET AL: "Expansion of human ductal pancreatic stem cells obtained from main duct, purified islet preparation, or exocrine tissue."            ACTA DIABETOLOGICA,            vol. 34, no. 2, 1997, page 107 XP001010264            6th Congress of the International Pancreas and Islet Transplant Association; Milano, Italia; 24-27 September 1997            abrégé</p>	1-18
Y	<p>-----</p> <p>KERR-CONTE J ET AL: "Model for islet cell neogenesis from adult human pancreatic ductal epithelium in vitro."            EXPERIMENTAL AND CLINICAL ENDOCRINOLOGY &amp; DIABETES,            vol. 105, no. 4, 1997, pages A28-A29,            XP001010265            Satellite Meeting to the 16th International Diabetes Federation Congress, Joint Meeting with the European Association for the Study of Diabetes Islet Study Group on Pancreatic Beta Cell and Islet Research 1997: Development, Destruction, Regeneration; Helsingor, Denmark; 26-28 July 1997            abrégé</p>	1-18
P, X	<p>-----</p> <p>WO 00 78929 A (BONNER WEIR SUSAN ;TANEJA MONICA (US); JOSLIN DIABETES CT INC (US))            28 décembre 2000 (2000-12-28)            le document en entier</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-18

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 01/02945

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	<p>GMYR V ET AL: "Human pancreatic ductal cells: Large-scale isolation and expansion."</p> <p>CELL TRANSPLANTATION, vol. 10, no. 1, janvier 2001 (2001-01), pages 109-121, XP001010271 le document en entier -----</p>	1-18

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux n...mbres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 01/02945

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0046351 A	10-08-2000	AU 2527900 A	25-08-2000
		WO 0046351 A2	10-08-2000
		EP 1144595 A2	17-10-2001
WO 0078929 A	28-12-2000	AU 5632600 A	09-01-2001
		EP 1185622 A1	13-03-2002
		WO 0078929 A1	28-12-2000

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**